

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

18.08.00

10-069439

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 8月19日

RECD 05 OCT 2000

WIPO

PCT

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第233301号

出願人
Applicant(s):

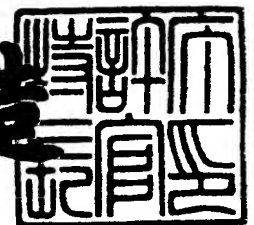
宮田 敏男
黒川 清

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3075958

【書類名】 特許願

【整理番号】 KRK-102

【提出日】 平成11年 8月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県伊勢原市東成瀬 4 - 2 - 3 - 1 0 1

 【氏名】 宮田 敏男

【特許出願人】

 【識別番号】 597142376

 【氏名又は名称】 宮田 敏男

【特許出願人】

 【識別番号】 597142387

 【氏名又は名称】 黒川 清

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 メグー 1 タンパク質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：2 のアミノ酸配列からなる請求項 1 に記載のタンパク質

。 【請求項 3】 請求項 1 に記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 4】 配列番号：1 におけるコード領域の塩基配列を含む請求項 3 に記載の DNA。

【請求項 5】 配列番号：1 におけるコード領域の塩基配列を持つ DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、請求項 1 に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】 配列番号 1 の塩基配列を持つ DNA と特異的にハイブリダイズする DNA であって、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つ DNA。

【請求項 7】 請求項 4 に記載の DNA もしくはその一部に対するアンチセンス DNA。

【請求項 8】 請求項 3、請求項 4、および請求項 5 のいずれかに記載の DNA を含むことを特徴とするベクター。

【請求項 9】 請求項 3、請求項 4、および請求項 5 のいずれかに記載の DNA を発現可能に保持する形質転換細胞。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の形質転換細胞を培養し、請求項 3、請求項 4、および請求項 5 のいずれかに記載の DNA の発現産物を回収することを特徴とする、請求項 1 に記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 11】 請求項 6 に記載の DNA を含むメサンギウム細胞の検出用試薬。

【請求項 12】 請求項 1 に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

【請求項 13】 配列番号：2 のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する請求項 12 に記載の抗体。

【請求項14】抗体がモノクローナル抗体である請求項13に記載の抗体。

【請求項15】請求項13または請求項14のいずれかに記載の抗体と請求項2に記載のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて請求項2に記載のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

【請求項16】請求項13または請求項14のいずれかに記載の抗体を含む請求項2に記載のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。

【請求項17】生体試料中に含まれる請求項2に記載のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎症を検出する方法。

【請求項18】メグー1をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項19】非ヒト脊椎動物がマウスである請求項18に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【請求項20】メグー1をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである請求項19に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

【0002】

【従来の技術】

体内の60兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノムDNAを有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

【0003】

メサングウム細胞(mesangial cell)は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そしてメサングウム細胞は、各種腎炎においても中心的な病態生理学的意義を有する。例えばメサングウム細胞の増殖、および細胞

外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者の糸球体硬化症の重要な病理所見である。従って、メサンギウム細胞で発現している遺伝子を見だしその機能を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

【0004】

メサンギウム細胞のマーカーとしては、ラットではThy1抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではない。ヒトではメサンギウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., Immunology(1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., Immunology(1990); 69: 391-395)。また、メサンギウム細胞は活性化されると α 平滑筋アクチンを発現することが知られているが、この遺伝子もメサンギウム細胞特異的ではない。このように、メサンギウム細胞に特徴的な遺伝子については、従来報告がなかった。

【0005】

なお本発明者は、先にメサンギウム細胞に特異的に発現しているタンパク質としてメグシンを報告している (J.Clin.Invest, 1998 Aug 15, 120:4, 828-36)。本発明は、このメグシンとも明確に異なった構造を持つ新規なタンパク質に関する。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、メサンギウム細胞で高度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

【0007】

【問題点を解決するための手段】

本発明者は、ヒトメサンギウム細胞のインビトロ培養物からmRNAを単離し、3'側のcDNAライブラリーを作成した。そしてこのcDNAライブラリーに含まれる多数のクローンをランダムに選択してその塩基配列を決定した。次いで決定した塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の3'側のcDNAクローンの塩基配列

と比較することによって、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンを選択した。そのうち、メサングウム細胞において特に出現頻度の高い1クローンを選択し、5' RACE法によって完全長cDNA(3928bp)を単離した。この完全長cDNAの全塩基配列を決定して本発明を完成した。更にKozakの翻訳開始コドン进行を明らかにし、オープンリーディングフレーム(ORF)を推定した。この推定アミノ酸配列を持つ本発明によるタンパク質を、本発明者はメグー1(Meg-1)と命名した。ヒト・メグー1のcDNAの塩基配列を配列番号:1に、ヒト・メグー1の推定アミノ酸配列を配列番号:2に示した。

【0008】

このアミノ酸配列について、SwissProtデータベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、メグー1が新規なタンパク質であることを確認した。更に本発明のメグー1の推定アミノ酸配列についてモチーフ検索を試みたところ、多くの既知のタンパク質ホスファターゼに共通するモチーフが見られた。また、核局在シグナル(nuclear localization signal)スコアが高く、核タンパク質である可能性が示唆された。

更にノーザンブロッティングによりメグー1の組織分布をみたところ、メグー1は、心および胎盤、次いで脳、骨格筋、腎および脾において高度な発現が観察された。その他に肝で弱い発現が観察され、肺での発現はほとんど観察されなかった。初代継代培養細胞の中では、メサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

【0009】

即ち、本発明は具体的には以下のタンパク質、DNA、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕配列番号:2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列を含み、このアミノ酸配列を含むタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

〔2〕配列番号:2のアミノ酸配列からなる〔1〕に記載のタンパク質。

〔3〕〔1〕に記載のタンパク質をコードするDNA。

〔4〕配列番号：1におけるコード領域の塩基配列を含む〔3〕に記載のDNA。

〔5〕配列番号：1におけるコード領域の塩基配列を持つDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、〔1〕に記載のタンパク質またはこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNA。

〔6〕配列番号1の塩基配列を持つDNAと特異的にハイブリダイズするDNAであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つDNA。

〔7〕〔4〕に記載のDNAもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。

〔8〕〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

〔9〕〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換細胞。

〔10〕〔9〕に記載の形質転換細胞を培養し、〔3〕、〔4〕、および〔5〕のいずれかに記載のDNAの発現産物を回収することを特徴とする、〔1〕に記載のタンパク質の製造方法。

〔11〕〔6〕に記載のDNAを含むメサンギウム細胞の検出用試薬。

〔12〕〔1〕に記載のタンパク質に結合することを特徴とする抗体。

〔13〕配列番号：2のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する〔12〕に記載の抗体。

〔14〕抗体がモノクローナル抗体である〔13〕に記載の抗体。

〔15〕〔13〕または〔14〕のいずれかに記載の抗体と〔2〕に記載のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて〔2〕に記載のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

〔16〕〔13〕または〔14〕のいずれかに記載の抗体を含む〔2〕に記載のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。

〔17〕生体試料中に含まれる〔2〕に記載のタンパク質またはその断片を測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサンギウム増殖性腎症を検出する方法。

〔18〕メグー1をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニ

ック非ヒト脊椎動物。

〔19〕非ヒト脊椎動物がマウスである〔18〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔20〕メグー1をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである〔19〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

【0010】

【発明の実施の形態】

前記課題を達成するために本発明者は、3'領域cDNAライブラリー(3'-directed cDNA library)を用いた。この方法により、cDNAの大きさを反映するクローニング効率の変動を回避することができる。3'領域の配列は遺伝子に特有なものであり、約200~300bpの配列データは、遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である(Yasuda, Y., Miyata T. et al., Kidney Int, 1998 Jan, 53:1, 154-8)。

【0011】

本発明のヒト・メグー1をコードするDNAは、メサングウム細胞からmRNAを調製した後、既知の方法により二本鎖cDNAに変換することにより得ることができる。mRNAの調製はグアニジンイソチオシアネート-塩化セシウム法[Chirwin, et al. Biochemistry 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法[Berger & Birkenmeier, Biochemistry 18, 5143 (1979)]などを用いることができる。全RNAからのpoly(A)⁺RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体(例えばセファロース、セルロースやラテックス粒子等)を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて行なうことができる。得られたmRNAを鋳型として、3'端にあるpoly(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)、ランダムプライマー、あるいはメグー1のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理することによってcDNA(1st strand)を得ることができる。mRNAとそれに相補的なcDNAとで構成されるハイブリッドのmRNAをE. Coli RNase Hで部分的に切断し、これをプライマーとしてE. Coli DNA polymerase IIによりcDNA(2nd strand)が合成される。最終的にE. Coli DNA Ligaseで処理することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

【0012】

ヒト・メグー 1 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサングウム細胞poly(A)⁺RNAを鋳形にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、ヒト・メグー 1 遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。マウスとラット等、ヒト以外の種におけるメグー 1 のホモログについても、同様の手法によりcDNAの取得が可能である。

【0013】

あるいは、メグー 1 のホモログのcDNAを以下のような手法によって単離することも可能である。~~すなわち、前記ヒト・メグー 1 cDNAの塩基配列をプローブとして~~用い、cDNAライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションやブランクハイブリダイゼーションによってスクリーニングして、メグー 1 のホモログをコードするcDNAを単離することができる。cDNAライブラリーは、マウス、ラットの組織や、培養メサングウム細胞等から抽出したmRNAを鋳型として合成することができる。あるいは、市販cDNAライブラリー（フナコシ製等）を用いることもできる。この他に、本発明によるヒト・メグー 1 のcDNAをもとに、ORFの前後にディジェネレーティブプライマーを設計し、これを利用したPCRによってホモログのcDNAを増幅する方法を用いることもできる。

【0014】

ヒト・メグー 1 ゲノムは、ゲノミックライブラリーのスクリーニングによって得ることができる。ゲノミックライブラリーは、たとえばヒトBリンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3で部分的に切断したDNAをファージベクターであるEMBL3に組み込むことにより合成することができる（Blood, vol 83, No 11, 1994: pp3126-3131）。このようなゲノミックライブラリーについて、ブランクハイブリダイゼーション法（新細胞工学実験プロトコール、秀潤社、pp79-92、参照）を行えば、目的とするゲノムを含むクローンを取得できる。プローブとしては、メグー 1 cDNAのORF全ての領域（2850bp）、またはcDNA部分をプライマーとしてヒトゲノムDNAをPCR法を用いて増幅することにより得られた各エキソン-イントロン

部分を用いることができる。また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサンギウム細胞由来mRNA、もしくはヒト腎臓mRNA (Clontech社より購入) を鋳型として、5' RACE法 (5'-Full RACE Core Set (宝酒造 (株) の方法に従う)) を用いて5' UTRの配列決定を行うことができる。

【0015】

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイド法 [Mattencchi, M.D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185(1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

【0016】

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に1個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じても、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、1個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2に示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り、すべて本発明に含まれる。

【0017】

その他、本発明のタンパク質には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および/または挿入されたアミノ酸配列を含み、本発明によるメグー1と機能的に同等なタンパク質が含まれる。なお本発明において機能的に同等とは、メグー1と同等の生物学的特性を持つことを意味する。本発明者は、メグー1にたとえば以下のような生物学的な特性を見出している。

【0018】

まず、メグー1はそのアミノ酸配列において、ヒトのみならず様々な種属のプ

ロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) の A ユニット (調節ユニット) と 20-30% のホモロジーを有する。一方 PP2A では、A ユニットの C 末端側に C ユニット (酵素活性の有る触媒ユニット)、そして N 末端側には B ユニット (組織や細胞に特異的なもう一つの調節ユニット) とが結合して 3 量体を形成することが知られている。そして A ユニットや C ユニットが組織や細胞の間で共通の構造を持つのに対して、B ユニットは組織や細胞に特異的な構造を持つと考えられている。これらの情報に基づけば、PP2A とのホモロジーを持つ本発明の メグー 1 を A ユニットとする B ユニットは、メサンギウム細胞に特異的なタンパク質である可能性が推測される。メグー 1 を A ユニットとする B ユニットには、PP2A とは異なった、メサンギウム細胞に特異的な活性制御機構が伴っているものと考えられる。

【0019】

またメグー 1 の発現特性は、メサンギウム初代培養細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他の初代培養細胞では、皮膚繊維芽細胞や腎皮質上皮細胞で発現が観察され、臍帯静脈内皮細胞、平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察された。組織間の比較においては、心および胎盤、次いで脳、骨格筋、腎および脾において高度な発現が観察された。その他に肝で弱い発現が観察され、肺での発現は観察されなかった。培養癌細胞株においては HeLa 細胞 S3、慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、大腸腺癌 SW480、および肺癌 A549 で強い発現が観察され、前骨髄白血病 HL-60、黒色腫 G361 でも発現が見られた。Burkitt リンパ腫 Raji では、ほとんど発現が見られなかった。各組織や培養細胞におけるメグー 1 の発現状態は、たとえば配列番号：1 から選択された塩基配列を持つプローブによって、各組織から調製した mRNA を試料としてノーザンブロットアッセイを行うことによって知ることができる。

【0020】

以上のような生物学的特性について、機能的に同等なタンパク質は、いずれも本発明によるメグー 1 を構成する。したがって、具体的に構造を明らかにしたヒトのメグー 1 のみならず、構造的にあるいは機能的に同等な他の種のホモログは本発明に含まれる。

【 0 0 2 1 】

ホモロジーサーチによって確認された公知のアミノ酸配列のうち、もっともメグー 1 に近い構造を持ったものは、PP4_{R1} (J. Biol. Chem. 274(9), 5339-5347, 1999) である。しかし PP4_{R1} は、ウシの小腸から単離されたタンパク質セリン／スレオニンフォスファターゼ 4 調整ユニットのヒト・ホモログとして報告されたタンパク質である。その構造においては、PP4_{R1} の N 末端から 18 位に存在する S が、メグー 1 では FGVDDYSSSESDVIIIPSA の 18 アミノ酸残基となっており、両者は異なった構造を持つタンパク質である。また機能的に見ても、メサンギウム細胞に高度に発現するメグー 1 に対して、PP4_{R1} はウシ小腸由来のタンパク質のアミノ酸配列に基づいて単離された神経上皮細胞由来のタンパク質であることから、両者は異なったタンパク質である。両者の間で相違するアミノ酸配列が連続していることから、メグー 1 と PP4_{R1} とは互いに alternative splicing form である可能性が考えられる。

【 0 0 2 2 】

また、本発明の DNA には、これらの機能的に同等なタンパク質をコードする DNA が含まれる。これらのタンパク質をコードする DNA は、cDNA のみならずゲノム DNA や合成 DNA であることもできる。

また、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、DNA を適宜改変したものもまた本発明の DNA に含まれる。所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5662 (1984)] 等にしながら、これら核酸配列のコドンを一部改変することができる。

【 0 0 2 3 】

更に、配列番号：1 に記載の塩基配列を含む DNA とハイブリダイズすることができ、かつその DNA によってコードされるタンパク質が本発明によるメグー 1 に特徴的な機能を有する限り、その DNA は本発明による DNA に含まれる。ストリンジ

ェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、一般的には以下のような条件を示すことができる。すなわち、 $4 \times \text{SSC}$ 、 65°C でハイブリダイゼーションさせ、 $0.1 \times \text{SSC}$ を用いて 65°C で1時間洗浄する。ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度(T_m)に応じて調整することができる。 T_m はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成(塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度)によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

変異体も含め本発明によるDNAの塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。

【0024】

このようにしてクローン化されたメグー1をコードする遺伝子は適当な発現ベクターDNAに組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合は、pET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)] 等が、COS細胞の場合はpEF-BOS [Nucleic Acids Research 18,5322 (1990)]、pSV2-gpt [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 78, 2072 (1981)] 等が、CHO細胞の場合はpVY1 [国際公開第89/03874号公報] 等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合タンパク質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的タンパク質を切り出すことも可能である。融合させるタンパク質としては、ヒスチジンタグ、c-mycタグ、MBP-タグ、あるいはGST-タグ等が知られている。これらのタグを融合させた状態でインサートを発現させることができるベクターは市販されている。

【0025】

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸

菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシェー (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。一方哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えばCOS細胞、CHO細胞、BHK細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

【0026】

以上のようにして目的とするメグー1をコードする遺伝子で形質転換した形質転換体を培養し、産生されたメグー1は、細胞内または細胞外から分離し均一なタンパク質にまで精製することができる。なお、本発明の目的タンパク質であるメグー1の分離、精製は、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、メグー1を分離、精製することができる。

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いたメグー1の製造過程における遺伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) に記載の常法に従って行うことができる。

【0027】

この他、配列番号：1に記載の塩基配列に基づいて、メグー1遺伝子を検出するためのプローブを設計することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設計することができる。与えられた塩基配列をもとに、プローブやプライマーを設計することは当業者が日常的に行っていることである。設計された塩基配列を持つオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは、PCRのような核酸の合成反応に利用することができる。プローブやプライマーに利用するオリゴヌクレオチドは、少なくとも15塩基、好適には25-50塩基の長さとするのが望ましい。大部分の塩基配列を共有しているPP4_{R1}との間で構造上の違いとなっている18アミノ酸残基をコードする領域(74-127)に相当する部分から選択した塩基配列を含むようにすれば、両者の識

別が可能なプローブ（あるいはプライマー）を設計することができる。

メグー 1 がメサングウム細胞で高度な発現を示すことから、本発明によるメグー 1 遺伝子を検出するためのプローブやプライマーは、メサングウム細胞の同定や検出に利用することができる。特にプライマーは、メグー 1 遺伝子の増幅においても有用である。

【 0 0 2 8 】

更に本発明が明らかにしたメグー 1 をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、メグー 1 の発現を制御しうるアンチセンス核酸が提供される。本発明によるアンチセンス核酸は、メグー 1 のメサングウム細胞における役割を明らかにするための重要なツールとなる。あるいはメグー 1 の発現亢進によってもたらされる病態の制御に有用である。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を抑制する作用と

しては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるタンパク質鎖に伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制、などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生物化学実験講座2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)。

【 0 0 2 9 】

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5' 端近傍の非翻訳

領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。使用されるアンチセンスDNAは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製されたDNAは、公知の方法で、所望の宿主へ形質転換できる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換する宿主が持つ内在性遺伝子（あるいはその相同遺伝子）、またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。

【0030】

アンチセンスDNAを鋳型として転写されたRNAが、標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%、最も好ましくは95%の相補性を有するように設計する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスDNAの長さは、少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常、用いられるアンチセンスRNAの長さは2.5kbよりも短い。

【0031】

更に本発明が提供するメグー1のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するメグー1遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することができる。具体的には、特開平6-181767号公報、「The Journal of Immunology(1995)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995),92,3561-3565」等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは3' UTRに存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域をいう。

【0032】

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

1) メグー 1 の cDNA の 5' 末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりメグー 1 のプロモーター領域をクローニングする。

2) 制限酵素消化してメグー 1 遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分 (2 ~ 5 kbp) のプロモーター領域を含む DNA を得、塩基配列を決定する。ヒトメサングウム細胞から調製した poly(A)⁺RNA を鋳型とし、メグー 1 遺伝子の 5' 末端側 cDNA 配列より選択したプライマー DNA を用いたプライマー伸長法により、転写開始点 (+1) を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。

3) 2) で得た DNA からメグー 1 遺伝子のコード領域を除いた DNA 断片をプラスミド上にサブクローニングし、この DNA 断片の 2 ~ 5 kbp 下流に、レポーター遺伝子としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素 (CAT) 遺伝子、あるいは、

ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性のある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、PCR により、5' 末端側及び 3' 末端側を順次削ったメグー 1 遺伝子上流部分の様々な部位に該当する DNA 断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としての CAT 遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞の CAT 或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、メグー 1 遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

また、3' UTR、イントロン中のエンハンサー領域は、メグー 1 cDNA をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト・メグー 1 のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。

【 0 0 3 3 】

メグー 1 遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコール (秀潤社)」、「バイオマニュアルシリーズ 5 転写因子研究法 (羊土社)」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティークラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリ

ンティング法、ゲルシフト法、またはone-hybrid法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とはメグー 1 遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転写調節因子をさす。

【0034】

アフィニティーカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有するDNAを用い、結合した転写因子を溶出することによって、メグー 1 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

【0035】

また、サウスウエスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター（例えば *gt11*）に挿入したcDNAの発現産物を標識プローブによってスクリーニングする。たとえばスクリーニングすべきcDNAを β -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現させ、これをニトロセルロース膜に吸着させる。次いで放射性同位元素で標識されたプロモーター領域やエンハンサー領域のDNA断片をプローブにし、結合活性をもつ融合タンパク質を合成するファージを選択することによって、メグー 1 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

【0036】

ゲルシフト法は、遊離のDNAがタンパク質と結合したときにポリアクリルアミドゲルによる電気泳動の移動度に差を生じる現象に基づいている。プロモーター領域やエンハンサー領域のDNA断片をプローブとし、転写因子が含まれる試料（たとえば核タンパク質抽出液）と混合して、低イオン強度の元で電気泳動分析する。転写因子の結合は、遊離のDNAとは違った移動度のバンドとして検出される。ゲルシフト法は、タンパク質の混合物から高い感度で転写因子を分離することができる。

【0037】

ゲルシフト法によって得られたDNAと転写因子の複合体を、更にフットプリント法によって解析すると、転写因子の結合部位を決定することができる。フット

プリント法は、DNA上にタンパク質が結合するとDNase Iの消化から保護される現象を利用している。すなわち、末端を³²Pで標識したプロモーター領域やエンハンサー領域のDNAを、転写因子の共存化でDNase Iによって部分消化し、これを塩基配列決定用の変性ポリアクリルアミドゲルで分離する。転写因子の無い状態で同様の処理を行った結果と比較すると、転写因子の結合によってバンドの消失が観察されることから、その結合部位の推定が可能となる。

【 0 0 3 8 】

本発明はまた、メグー 1 を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、例えば、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグー 1 または本発明のメグー 1 の部分ペプチドに対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のメグー 1、本発明のメグー 1 の部分ペプチド、あるいは本発明によるc-myc-(His)₆-Tag-メグー 1 やMBP-メグー 1 のような融合タンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【 0 0 3 9 】

本発明のメグー 1、または本発明のメグー 1 の部分ペプチドは、温血動物に対して投与による抗体産生が可能な部位に、公知の担体や希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常1～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。抗体産生に用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、あるいはニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびウサギが好ましく用いられる。

【 0 0 4 0 】

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化メグー 1 と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作

は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495 (1975)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンドイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

【0041】

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などが挙げられるが、X-63Ag8が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20~20:1であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗メグー1抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えばメグー1抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相（例えば、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体）が用いられる。またはプロテインAを加え、固相に結合した抗メグー1モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグー1を加え、固相に結合した抗メグー1モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

【0042】

抗メグー1モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地（大日本製薬（株））、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））、またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は

、上記の抗血清中の抗メグー 1 抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は腹水化して得ることもできる。

【0043】

本発明によるモノクローナル抗体は、メグー 1 に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも 7 以上のアミノ酸残基、望ましくは 10-20 アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも 7 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるメグー 1 特異的なモノクローナル抗体といえる。より具体的には、たとえば前記 PP_{4R1} との構造上の違いをもたらしている 18 アミノ酸残基（N 末端から 18-35 位）からなる領域を認識し、たとえば PP_{4R1} のような相同性の高いタンパク質との構造的な違いを識別する抗体は、本発明によるメグー 1 を認識する抗体の望ましい態様と言う事ができる。

【0044】

抗メグー 1 モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えば DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテイン A または プロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

【0045】

このようにして得られたメグー 1 を認識する本発明によるモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体は、メサングウム細胞に関連する疾病の診断や治

療に利用することが可能である。またメグー 1 がメサンギウム細胞に高度に発現しているタンパク質であることから、メサンギウム細胞の同定や検出のためのツールとしても、これらの抗体を利用することができる。細胞が持つタンパク質を免疫学的に検出する方法は公知である。またこれらの抗体を用いてメグー 1 を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりメグー 1 を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト・メグー 1 と検体中のヒト由来メグー 1 を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト由来メグー 1 を測定する競合法等を示すことができる。

【0046】

サンドイッチ法によるメグー 1 の測定においては、まず、固定化抗体とメグー 1 とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-メグー 1 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法、もしくは固定化抗体、標識化抗体およびメグー 1 を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

【0047】

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、粒子状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

【0048】

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート及びN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド

法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

【0049】

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、あるいは ^{35}S 等が挙げられる。

【0050】

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエス

テル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えばFab'、Fab、F(ab')₂を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサル(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存することにより、より長期にわたって保存することができる。

【0051】

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液としてH₂O₂を用い、発色剤として2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩(ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができる。酵素にβ-D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレイン-ジ-(β-D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル-β-D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノク

ローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグー1の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したものをも含むものである。

【0052】

本発明におけるメグー1の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、メグー1、あるいはメグー1の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。

【0053】

加えて本発明は、メグー1遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。ここでメグー1遺伝子とは、メグー1をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には、転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック動物は、メグー1の機能あるいは発現調節の研究、ヒトのメサングウム細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

【0054】

本発明においては、メグー1遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して人工的に上昇または下降するように修飾することができる。このような修飾は、メグー1遺伝子の転写の調節である。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、タンパク質への翻訳を修飾することもできる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

【0055】

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトさせた動物、点突然変異

DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。本明細書中というトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む。

トランスジェニック動物の作製方法は、遺伝子と卵を混合させてリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等が開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al. *Cell*, 57, 717, 1989）。

【0056】

あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系や*Saccharomyces cerevisiae*のFLPリコンビナーゼ系等の*in vivo*において部位特異的遺伝子組み換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

【0057】

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば以下に示すようにして行われる。まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリAシグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物は系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリAシグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いら

れる。

【0058】

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約10～15個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否か、尾の先端部からゲノムDNAを抽出し、サザン法あるいはPCR法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により選択することができる。さらに、トランスジーンの発現を確認するため、ノザン法もしくはRT-PCR法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティング法による検出も可能である。

【0059】

本発明のノックアウトマウスは、マウスメグー1遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術で任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や8細胞期胚に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含むものである。

【0060】

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の

選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

【0061】

【実施例】

【実施例1】ヒトメサンギウム細胞の初代培養

58才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサンギウム細胞を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200 μm の孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100 $\mu\text{g/mL}$ のコラゲナーゼ (Washington Biochemical社製) と共に37℃で20分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM HEPES、10% Nu-serum (Collaborative Biomedical Products社, Bedford, MA) および抗生物質 (10 $\mu\text{g/mL}$ のペニシリン、ストレプトマイシン、およびファンギゾン) を含む培地199 (Gibco BRL社, Gaithersburg, MD) に再懸濁させ、5%CO₂ インキュベーター内でインキュベートした。3継代目に、メサンギウム細胞を、典型的な形態学的特徴、トリプシン、ピューロマイシンおよびD-バリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories社, San Francisco, CA) 、抗VLA(very late antigen)-1,3,5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第VIII因子 (Dako社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

【0062】

【実施例2】ヒト培養メサンギウム細胞からのmRNAの単離

6継代目に、グアニジンイソチオシアネート (GTC) 法を用いて、全RNAをヒト

メサングウム細胞から単離した。即ち、実施例 1 の細胞の血清を含む培養液中のメサングウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5mM GTC溶液中で溶解させた。DNAは18ゲージの針を通過させることにより除去した。核およびその他の細胞破片は5,000×gで90秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、15℃、125,000×gで24時間遠心分離した。RNAペレットをTEバッファーに溶解させた。オリゴdTセルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)⁺RNAを分離した。

【0063】

[実施例 3] 3' 領域cDNAライブラリーの構築

poly(A)⁺RNAを鋳型として、pUC19を基礎とするベクタープライマー [Norlander J., et al., Gene, 26, 101-106 (1983)] を用いたcDNA合成を行った。このベクタープライマーDNAは、HincII末端、およびTテールをもつPstI末端を有し、MboI部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第2鎖の合成の後、cDNA配列、およびベクターのlacZ遺伝子内の単一BamHI部位を、それぞれMboIおよびBamHIで切断し、次に、低DNA濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA挿入配列を、pUC19クローニングサイトに隣接するプライマー (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' / 配列番号: 3 および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' / 配列番号: 4) を用いたペアードPCRにより増幅させた。得られた短い二本鎖DNAを、サイクル配列決定反応に用い、自動配列決定機で解析した。

【0064】

[実施例 4] メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離

メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者は、大規模なDNA配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このことにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較することができた (Y. Yasuda et al., Kidney International 53:154-158, 1998; K. Matsubara et al., Gene. 135, 265 (1993); K. Okub et al., Nat. Gen. 2, 173 (

1992))。ヒト培養メサンギウム細胞の3'領域cDNAライブラリーの大規模DNA配列決定を行い、ランダムに選択した1836個のクローンの部分配列を決定した。クローンの配列相同性を、相互に比較し、さらにFASTAプログラムを用いてDNAデータベースGenBankと比較した。様々な臓器および細胞からのmRNAをドットプロット解析することにより、メサンギウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択された。その結果、本発明者のメサンギウム細胞cDNAライブラリーにおいてきわめて高い頻度で検出されるいくつかのクローンが得られた。

【0065】

〔実施例5〕 5' RACE法による完全長cDNAのクローニング

「5'-Full RACE Core Set」(宝酒造(株)製)を用いて、下記の実験を行った。0.5mLマイクロチューブにヒト培養メサンギウム細胞から調製したpoly(A)⁺RNA (0.5 μg/μL) 4.0 μL、10×RTバッファー1.5 μL、RNaseインヒビター (40U/μL) 0.5 μL、AMV Reverse Transcriptase XL (5U/μL) 1 μL、5'末端リン酸化RTプライマー (5' - pTCAGAGAGGTCATTC/配列番号: 5、200pmol/μL) 1 μLを加え、RNase Free dH₂O 7 μLで全量を15 μLとした。この反応液を「Takara PCR Thermal Cycler」(宝酒造(株)製)にセットし、30℃10分、50℃60分、80℃2分、4℃10分インキュベーションし、第1鎖cDNAを得た。

反応液から15 μLを5×ハイブリッドRNA変性バッファー15 μL、H₂O 45 μLを含む0.5mLマイクロチューブ中に加えた。RNaseH 1 μLを加え、30℃で1時間反応させた。反応終了後、エタノール150 μLを加え-70℃で30分冷却後、遠心し、上清を除去し、沈殿物を集めた。

得られた沈殿物に5×RNA (ssDNA) ライゲーションバッファー8 μL、40% PEG #600 20 μL、H₂O 12 μLを加え、よく混ぜ、T4リガーゼを1 μL加えて16℃で15時間反応し、環化一本鎖cDNAを得た。

得られた環化一本鎖cDNAをTEバッファーで10倍希釈したものを鋳型とし、一次PCRをおこなった。反応条件は、10×LA PCRバッファーII (Mg²⁺plus) 5 μL、dNT P混合物 (2.5mM) 8 μL、一次PCR S1プライマー (5'-TCATTGATGGGTCCTCAA/配列番号: 6、20pmol/μL) 0.5 μL、一次PCR A1プライマー (5'-AGATTCTTGAGCTCAGAT/配列番号: 7、20pmol/μL) 0.5 μL、TaKaRa LA TaqTM (5U/μL) 0.5 μL、滅菌

水で全量を50 μ Lとした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94℃3分加熱後、94℃30秒、60℃30秒、72℃2分を25サイクル反応させた。

一次PCR反応溶液から1 μ Lを鋳型とし、10 \times LA PCR TMバッファ-II (Mg^{2+} plus) 5 μ L、dNTP混合物 (2.5mM) 8 μ L、二次PCR S2プライマー (5'-AATGGTGGCATAAA CATG/配列番号: 8、20pmol/ μ L) 0.5 μ L、二次PCR A2プライマー (5'-ACAGACA AATTGAACTTC/配列番号: 9、20pmol/ μ L) 0.5 μ L、TaKaRa LA TaqTM (5U/ μ L) 0.5 μ L、滅菌水で全量を50 μ Lとした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94℃30秒、60℃30秒、72℃2分で30サイクル反応させた。

0.75%アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液中から1 μ Lを「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen社)を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドに挿入された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

その結果、得られた塩基配列は、遺伝子産物のN末部分をコードする領域を含み5'非翻訳領域として約50ヌクレオチドを含んでいた。予想される開始コドンATGの位置が、コンセンサス配列と一致し、最長のORF(「the first ATG rule」を満足する)を与えた。このcDNAの塩基配列において最も長いORFに基づく950アミノ酸残基を遺伝子産物の推定アミノ酸配列とした。このアミノ酸配列を持つタンパク質を本発明者はメグー1(Meg-1)と名づけた。meg-1 cDNAの塩基配列を配列番号: 1に、meg-1の推定アミノ酸配列を配列番号: 2に示す。

【0066】

【実施例6】メサングウム特異的遺伝子の機能解析(1)

SwissProtデータベースでFASTAプログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、このメグー1が新規なタンパク質であることを確認した。またホモロジーを持つタンパク質としては、プロテインセリン/スレオニンフォスファターゼ4関連タンパク質PP4_{R1}が確認された。メグー1とPP4_{R1}は、アミノ酸配列において97.9%、cDNAの塩基配列においては98.3%のホモロジーを持つ。その他、配列番号: 2として示すアミノ酸配列の一部(778位-950位の173アミノ酸残基)は、胎児脳由来のESTとして登録されたcDNAの塩基配列(HSU 79267)と塩基配列で99.4%、アミノ酸配列で100%一致している。このクローンはI

MAGE c nsortiumによるSoares library 1NIBに由来するもので、単に塩基配列の一部を決定したにすぎず、その機能やボディマッピングについてはまったく知られていない。

【 0 0 6 7 】

続いてメグー 1 のアミノ酸配列をモチーフ検索した。検索には、PSORT WWW Server(<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)、およびMOTIF(<http://www.motif.genome.ad.jp/>)を利用した。その結果、メグー 1 はいくつかのリン酸化モチーフを含んでいることが明らかとなった。具体的には、以下のリン酸化酵素によるリン酸化モチーフの存在が確認された。その他に、6つのN-グリコシレーション部位が認められた。更に核移行シグナルの存在が示唆され、推測される核局在は52.2%であった。

cAMP/cGMP依存性タンパク質リン酸化部位：1

カゼイン・カイネースIIリン酸化部位：2 2

プロテインカイネースCリン酸化部位：1 1

チロシンカイネースリン酸化部位：2

また、これらの事実に基づいて、950アミノ酸残基からなる上記推定アミノ酸配列がメグー 1 のアミノ酸配列であることが確認された。このアミノ酸配列からなるタンパク質の p I の理論値は4.49である。

【 0 0 6 8 】

【実施例 7】メグー 1 の機能解析 (2) -組織分布

メグー 1 のノーザンブロット解析は、以下のようにして行った。3'領域cDNAライブラリー (実施例 3) のポジティブクローンのインサートを、ランダムDNAラベリングによってRI標識しプローブとして用いた。試料として以下の細胞から単離したpoly(A)⁺RNA (2μg) を、2.2Mホルムアミドを含む1%アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターをRapid Hyb溶液 (Amersham社, Arlington Heights, IL) 中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に、60℃で、0.1×SSPE/0.1%SDSという最終ストリンジェンシーで洗浄した。

【 0 0 6 9 】

ヒトの複数の初代培養細胞および組織のノーザンブロット、ヒトの癌細胞株のノーザンブロットのための試料は、Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。初代培養細胞としては、メサンギウム細胞、ヒト皮膚上皮細胞、ヒト腎皮質上皮細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、およびヒト平滑筋細胞の初代培養細胞由来の2 μ g のpoly(A)⁺RNAを試料とした。ヒトの癌細胞株のノーザンブロットには、前骨髄球白血病HL-60、HeLa細胞S3、慢性骨髄性白血病K-562、リンパ芽球白血病MOLT-4、Burkittリンパ腫Raji、大腸腺癌SW480、肺癌A549、および黒色腫G361由来の2 μ g のpoly(A)⁺RNAを試料とした。組織のノーザンブロットには、心、脳、胎盤、肺、肝、骨格筋、腎、および臍由来の2 μ g のpoly(A)⁺RNAを試料とした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。結果は表1-3に示すとおりである。

【0070】

【表1】

初代培養細胞

ヒトメサンギウム細胞	+++
ヒト皮膚繊維芽細胞	++
ヒト腎皮質上皮細胞	+
ヒト臍帯静脈内皮細胞	±~+
ヒト平滑筋細胞	±~+

【0071】

【表2】

ヒト癌細胞株

前骨髄球白血病HL-60	++
HeLa細胞S3	+++

慢性骨髓性白血病K-562	+++
リンパ芽球白血病MOLT-4	+++
Burkittリンパ腫Raji	-~±
大腸腺癌SW480	+++
肺癌A549	+++
黒色腫G361	++

【0072】

【表3】

ヒト組織

心	+++
脳	++
胎盤	+++
肺	-
肝	+
骨格筋	++
腎	++
脾	++

【0073】

メグー1 cDNAプローブを用いたノーザンブロット解析で、メサングウム培養細胞に単一の転写産物（約4.5kb）が検出された。ヒトの初代培養細胞においては、メグー1 遺伝子がメサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他の初代培養細胞では、皮膚繊維芽細胞や腎皮質上皮細胞で発現が観察され、臍帯静脈内皮細胞、平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察された。組織間の比較においては心および胎盤、次いで脳、骨格筋、腎および脾において高度な発現が観察された。その他に肝で弱い発現が観察され、肺での発現は

観察されなかった。培養癌細胞株においてはHeLa細胞S3、慢性骨髄性白血病K-562、リンパ芽球白血病MOLT-4、大腸腺癌SW480、および肺癌A549で強い発現が観察され、前骨髄白血病HL-60、黒色腫G361でも発現が見られた。Burkittリンパ腫Rajiでは、ほとんど発現が見られなかった。

【0074】

【実施例8】メグー1の機能解析 (3) - インサイチュハイブリダイゼーション

健常人の腎臓から得られたヒト腎組織を用いたインサイチュハイブリダイゼーションにより、メグー1のmRNAの組織内における発現状態を評価した。インサイチュハイブリダイゼーションは、公知の方法により行った (Kidney Int., 52, 11 (1997))。ヒト・メグー1の2879～2912位の塩基配列 (配列番号: 1

0) をプローブとして用いた。図1に示すように、糸球体のメサンギウム領域の細胞がメグー1 mRNA陽性であることを確認した。

【0075】

【発明の効果】

本発明により、メサンギウム細胞に高頻度に発現しているDNA、該DNAのコードするタンパク質、該タンパク質に結合する抗体等が提供された。これらはメサンギウム細胞に特異的な生理活性に深く関与していると推測され、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

【0076】

具体的には、たとえばメグー1の人為的な調節によって、糸球体腎炎の発症や進展を制御できる可能性がある。あるいはメサンギウム細胞や体液中のメグー1タンパク質やmRNAの定量によって、糸球体腎炎などの腎疾患の診断が可能となることが期待できる。糸球体腎炎ではメサンギウム領域の機能異常が見られ、メサンギウム細胞の増殖、あるいは細胞からのマトリックス基質の産生亢進が起きている。これらの病態にメグー1が関与している可能性は十分に考えられる。

【 0 0 7 7 】

本発明によるメグー 1 は、メサングウム細胞で高度に発現しているという点では、本発明者が先に報告したメグシンと共通の特徴を備えている。しかしながら本発明によるメグー 1 はホスファターゼとの相同性を示し、核移行シグナルを持った核タンパク質である可能性が示唆されるのに対して、メグシンはプロテアーゼインヒビターであるSERPINスーパーファミリーとの相同性を持つタンパク質である。また本発明によるメグー 1 が比較的広範囲な組織において発現が観察されている点は、メグシンのメサングウム細胞に特異的に発現しているという特徴と相違する。したがって本発明によるメグー 1 は、メサングウム細胞の機能を支える重要なタンパク質である可能性を持っている。このような重要なタンパク質の存在を明らかにした本発明の意義は大きい。

【 0 0 7 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, TOSHIO

KUROKAWA, KIYOSHI

<120> Meg-1 protein

<130> KRK-102

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3901

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(2872)

<400> 1

gggaggaggg ggcgaccaca ag atg gcg gac ctc tcg ctg ctt cag gag gac 52

Met Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gln Glu Asp

1

5

10

ctg cag gag gac gca gac gga ttt ggt gtg gat gac tac agc tca gag 100

Leu Gln Glu Asp Ala Asp Gly Phe Gly Val Asp Asp Tyr Ser Ser Glu

15

20

25

tct gat gtg att att ata cct tca gcc ctg gac ttt gtc tca caa gat 148

Ser Asp Val Ile Ile Ile Pro Ser Ala Leu Asp Phe Val Ser Gln Asp

30

35

40

gaa atg ttg acg ccc ctg ggg aga ttg gac aag tat gct gca agt gag 196

Glu Met Leu Thr Pro Leu Gly Arg Leu Asp Lys Tyr Ala Ala Ser Glu

45

50

55

aac ata ttt aac aga caa atg gtg gcc cgg agt ttg ctc gat acc ttg 244

Asn Ile Phe Asn Arg Gln Met Val Ala Arg Ser Leu Leu Asp Thr Leu

60

65

70

agg gaa gtc tgc gat gat gaa aga gat tgt att gct gtt ttg gaa aga 292

Arg Glu Val Cys Asp Asp Glu Arg Asp Cys Ile Ala Val Leu Glu Arg

75

80

85

90

att agc aga ttg gcc gat gat tca gaa cca act gtg aga gcg gag ctg 340

Ile Ser Arg Leu Ala Asp Asp Ser Glu Pro Thr Val Arg Ala Glu Leu

95

100

105

atg gaa cag gtg cct cac atc gca ctg ttt tgt caa gaa aac cgg cct 388

Met Glu Gln Val Pro His Ile Ala Leu Phe Cys Gln Glu Asn Arg Pro

110

115

120

tca ata cca tat gct ttt tca aaa ttc tta cta cct att gtg gtt aga 436

Ser Ile Pro Tyr Ala Phe Ser Lys Phe Leu Leu Pro Ile Val Val Arg

125

130

135

tac ctt gca gat cag aat aat cag gtg agg aaa aca agt cag gca gct 484

Tyr Leu Ala Asp Gln Asn Asn Gln Val Arg Lys Thr Ser Gln Ala Ala

140

145

150

ttg ctg gct ctg ttg gag cag gag ctc att gaa cga ttt gat gtg gag 532

Leu Leu Ala Leu Leu Glu Gln Glu Leu Ile Glu Arg Phe Asp Val Glu

155

160

165

170

acc aaa gtg tgg cct gtc ctc ata gag ctg aca gcc cca gat agc aat 580

Thr Lys Val Trp Pro Val Leu Ile Glu Leu Thr Ala Pro Asp Ser Asn

175

180

185

gat gat gtg aaa aca gaa gct gtg gct ata atg tgc aaa atg gct ccc 628

Asp Asp Val Lys Thr Glu Ala Val Ala Ile Met Cys Lys Met Ala Pro

190

195

200

atg gtt ggg aag gat att aca gag cgt ctt atc ctc cct agg ttt tgt 676

Met Val Gly Lys Asp Ile Thr Glu Arg Leu Ile Leu Pro Arg Phe Cys

205

210

215

gag atg tgc tgc gat tgc aga atg ttt cac gtt cga aag gtc tgt gct 724

Glu Met Cys Cys Asp Cys Arg Met Phe His Val Arg Lys Val Cys Ala

220

225

230

gcc aat ttt gga gat att tgc agt gta gtt ggc cag caa gct act gaa 772

Ala Asn Phe Gly Asp Ile Cys Ser Val Val Gly Gln Gln Ala Thr Glu

235

240

245

250

gaa atg ttg ctg ccc aga ttt ttc cag ctt tgt tct gat aat gta tgg 820

Glu Met Leu Leu Pro Arg Phe Phe Gln Leu Cys Ser Asp Asn Val Trp

255

260

265

gga gtc cga aag gct tgt gct gaa tgc ttc atg gcg gtt tca tgt gca 868

Gly Val Arg Lys Ala Cys Ala Glu Cys Phe Met Ala Val Ser Cys Ala

270

275

280

aca tgt caa gaa atc cga cgg acc aaa tta tca gca ctt ttt att aat 916

Thr Cys Gln Glu Ile Arg Arg Thr Lys Leu Ser Ala Leu Phe Ile Asn

285

290

295

ttg atc agt gat cct tca cgt tgg gtt cgc caa gca gct ttt cag tct 964

Leu Ile Ser Asp Pro Ser Arg Trp Val Arg Gln Ala Ala Phe Gln Ser

300

305

310

ctg gga cct ttc ata tct act ttt gct aat cca tct agc tca ggc cag 1012

Leu Gly Pro Phe Ile Ser Thr Phe Ala Asn Pro Ser Ser Ser Gly Gln

315

320

325

330

tat ttt aaa gaa gaa agc aaa agt tca gaa gag atg tca gta gaa aac 1060

Tyr Phe Lys Glu Glu Ser Lys Ser Ser Glu Glu Met Ser Val Glu Asn

335

340

345

aaa aat agg acc aga gat caa gaa gcc cca gag gat gta caa gtc agg 1108

Lys Asn Arg Thr Arg Asp Gln Glu Ala Pro Glu Asp Val Gln Val Arg

350

355

360

cca gag gat act cct tca gat ctc agt gtt agt aat tcc agt gtc ata 1156

Pro Glu Asp Thr Pro Ser Asp Leu Ser Val Ser Asn Ser Ser Val Ile

365

370

375

ctg gaa aac acg atg gaa gac cat gct gct gag gca tcc ggg aag cct 1204

Leu Glu Asn Thr Met Glu Asp His Ala Ala Glu Ala Ser Gly Lys Pro

380

385

390

cta ggt gaa att agt gtt cca ctg gac agc tct tta ctt tgt act ttg 1252

Leu Gly Glu Ile Ser Val Pro Leu Asp Ser Ser Leu Leu Cys Thr Leu

395

400

405

410

tcc tca gaa tct cac cag gaa gca gct agt aat gag aat gat aaa aaa 1300

Ser Ser Glu Ser His Gln Glu Ala Ala Ser Asn Glu Asn Asp Lys Lys

415

420

425

cct ggt aac tac aaa tct atg tta cga cca gag gtt ggc acc act tca 1348

Pro Gly Asn Tyr Lys Ser Met Leu Arg Pro Glu Val Gly Thr Thr Ser

430

435

440

caa gat tca gct ctc tta gat cag gaa ttg tat aac tcc ttc cat ttc 1396

Gln Asp Ser Ala Leu Leu Asp Gln Glu Leu Tyr Asn Ser Phe His Phe

445

450

455

tgg agg act cct ctt cct gaa ata gat cta gac ata gag ctt gaa cag 1444

Trp Arg Thr Pro Leu Pro Glu Ile Asp Leu Asp Ile Glu Leu Glu Gln

460

465

470

aac tct ggg gga aaa ccc agc cca gag gga cca gag gaa gaa tct gag 1492

Asn Ser Gly Gly Lys Pro Ser Pro Glu Gly Pro Glu Glu Glu Ser Glu

475

480

485

490

ggc cct gtg ccc agt tct cca aac atc acc atg gcc acc aga aag gaa 1540

Gly Pro Val Pro Ser Ser Pro Asn Ile Thr Met Ala Thr Arg Lys Glu

495

500

505

ctg gaa gaa atg ata gaa aat cta gag ccc cac att gat gat cca gat 1588

Leu Glu Glu Met Ile Glu Asn Leu Glu Pro His Ile Asp Asp Pro Asp

510

515

520

gtt aaa gca caa gtg gaa gtg ctg tcc gct gca cta cgt gct tcc agc 1636

Val Lys Ala Gln Val Glu Val Leu Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Ser

525

530

535

ctg gat gca cat gaa gag acc atc agt ata gaa aag aga agt gat ttg 1684

Leu Asp Ala His Glu Glu Thr Ile Ser Ile Glu Lys Arg Ser Asp Leu

540

545

550

caa gat gaa ctg gat ata aat gag cta cca aat tgt aaa ata aat caa 1732

Gln Asp Glu Leu Asp Ile Asn Glu Leu Pro Asn Cys Lys Ile Asn Gln

555

560

565

570

gaa gat tct gtg cct tta atc agc gat gct gtt gag aat atg gac tcc 1780

Glu Asp Ser Val Pro Leu Ile Ser Asp Ala Val Glu Asn Met Asp Ser

575

580

585

act ctt cac tat att cac aac gat tca gac ttg agc aac aat agc agt 1828

Thr Leu His Tyr Ile His Asn Asp Ser Asp Leu Ser Asn Asn Ser Ser

590

595

600

ttt agc cct gat gag gaa agg aga act aaa gta caa gat gtt gta cct 1876

Phe Ser Pro Asp Glu Glu Arg Arg Thr Lys Val Gln Asp Val Val Pro

605

610

615

cag gcg ttg tta gat cag tat tta tct atg act gac cct tct cgt gca 1924

Gln Ala Leu Leu Asp Gln Tyr Leu Ser Met Thr Asp Pro Ser Arg Ala

620

625

630

cag acg gtt gac act gaa att gct aag cac tgt gca tat agc ctc cct 1972

Gln Thr Val Asp Thr Glu Ile Ala Lys His Cys Ala Tyr Ser Leu Pro

635

640

645

650

ggt gtg gcc ttg aca ctc gga aga cag aat tgg cac tgc ctg aga gag 2020

Gly Val Ala Leu Thr Leu Gly Arg Gln Asn Trp His Cys Leu Arg Glu

655

660

665

acg tat gag act ctg gcc tca gac atg cag tgg aaa gtt cga cga act 2068

Thr Tyr Glu Thr Leu Ala Ser Asp Met Gln Trp Lys Val Arg Arg Thr

670

675

680

cta gca ttc tcc atc cac gag ctt gca gtt att ctt gga gat caa ttg 2116

Leu Ala Phe Ser Ile His Glu Leu Ala Val Ile Leu Gly Asp Gln Leu

685

690

695

aca gct gca gat ctg gtt cca att ttt aat gga ttt tta aaa gac ctc 2164

Thr Ala Ala Asp Leu Val Pro Ile Phe Asn Gly Phe Leu Lys Asp Leu

700

705

710

gat gaa gtc agg ata ggt gtt ctt aaa cac ttg cat gat ttt ctg aag 2212

Asp Glu Val Arg Ile Gly Val Leu Lys His Leu His Asp Phe Leu Lys

715

720

725

730

ctt ctt cat att gac aaa aga aga gaa tat ctt tat caa ctt cag gag 2260

Leu Leu His Ile Asp Lys Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Gln Leu Gln Glu

735

740

745

ttt ttg gtg aca gat aat agt aga aat tgg cgg ttt cga gct gaa ctg 2308

Phe Leu Val Thr Asp Asn Ser Arg Asn Trp Arg Phe Arg Ala Glu Leu

750

755

760

gct gaa cag ctg att tta ctt cta gag tta tat agt ccc aga gat gtt 2356

Ala Glu Gln Leu Ile Leu Leu Leu Glu Leu Tyr Ser Pro Arg Asp Val

765

770

775

tat gac tat tta cgt ccc att gct ctg aat ctg tgt gca gac aaa gtt 2404

Tyr Asp Tyr Leu Arg Pro Ile Ala Leu Asn Leu Cys Ala Asp Lys Val

780

785

790

tct tct gtt cgt tgg att tcc tac aag ttg gtc agc gag atg gtg aag 2452

Ser Ser Val Arg Trp Ile Ser Tyr Lys Leu Val Ser Glu Met Val Lys

795

800

805

810

aag ctg cac gcg gca aca cca cca acg ttc gga gtg gac ctc atc aat 2500

Lys Leu His Ala Ala Thr Pro Pro Thr Phe Gly Val Asp Leu Ile Asn

815

820

825

gag ctt gtg gag aac ttt ggc aga tgt ccc aag tgg tct ggt cgg caa 2548

Glu Leu Val Glu Asn Phe Gly Arg Cys Pro Lys Trp Ser Gly Arg Gln

830

835

840

gcc ttt gtc ttt gtc tgc cag act gtc att gag gat gac tgc ctt ccc 2596

Ala Phe Val Phe Val Cys Gln Thr Val Ile Glu Asp Asp Cys Leu Pro

845

850

855

atg gac cag ttt gct gtg cat ctc atg ccg cat ctg cta acc tta gca 2644

Met Asp Gln Phe Ala Val His Leu Met Pro His Leu Leu Thr Leu Ala

860

865

870

aat gac agg gtt cct aac gtg cga gtg ctg ctt gca aag aca tta aga 2692

Asn Asp Arg Val Pro Asn Val Arg Val Leu Leu Ala Lys Thr Leu Arg
875 880 885 890

caa act cta cta gaa aaa gac tat ttc ttg gcc tct gcc agc tgc cac 2740
Gln Thr Leu Leu Glu Lys Asp Tyr Phe Leu Ala Ser Ala Ser Cys His
895 900 905

cag gag gct gtg gag cag acc atc atg gct ctt cag atg gac cgt gac 2788
Gln Glu Ala Val Glu Gln Thr Ile Met Ala Leu Gln Met Asp Arg Asp
910 915 920

agc gat gtc aag tat ttt gca agc atc cac cct gcc agt acc aaa atc 2836
Ser Asp Val Lys Tyr Phe Ala Ser Ile His Pro Ala Ser Thr Lys Ile
925 930 935

tcc gaa gat gcc atg agc aca gcg tcc tca acc tac tagaaggctt 2882
Ser Glu Asp Ala Met Ser Thr Ala Ser Ser Thr Tyr
940 945 950

gaatctcggg gtcttttctg ctccatgag agccgagggt cagtgggcat tcgccacgca 2942

tgtgacctgg gatagctttc gggggaggag agaccttcct ctccctgcgga cttcattgca 3002

ggtgcaagtt gcctacaccc aataccaggg atttcaagag tcaagagaaa gtacagtaaa 3062

cactattatc ttatcttgac tttaagggga aataatttct cagaggatta taattgtcac 3122

cgaagcctta aatccttctc ttccctgactg aatgaaactt gaattggcag agcattttcc 3182

ttatggaagg gatgagattc ccagagacct gcattgcttt ctctgggttt tatttaacaa 3242

tcgacaaatg aaattcttac agcctgaagg cagacgtgtg cccagatgtg aaagagacct 3302

tcagtatcag ccctaactct tctctcccag gaaggacttg ctgggctctg tggccagctg 3362

tccagcccag ccctgtgtgt gaatcgtttg tgacgtgtgc aaatgggaaa ggaggggttt 3422

ttacatctcc taaaggacct gatgccaaca caagtaggat tgacttaaac tcttaagcgc 3482

agcatattgc tgtacacatt tacagaatgg ttgctgagtg tctgtgtctg attttttcat 3542

gctggtcatt acctgaagga aatttattag acgtataatg tatgtctggt gtttttaact 3602

tgatcatgat cagctctgag gtgcaacttc ttcacatact gtacatacct gtgaccactc 3662

ttgggagtgc tgcagtcttt aatcatgctg tttaaactgt tgtggcacia gttctcttgt 3722

ccaaataaaa tttattaata agatctatag agagagatat atacactttt gattgttttc 3782

tagatgtcta ccaataaatg caatttgtga cctgtattaa tgatttaaag tggggaaact 3842

agattaaaat atttgtcttt taaaaaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3901

<210> 2

<211> 950

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gln Glu Asp Leu Gln Glu Asp Ala Asp

1 5 10 15

Gly Phe Gly Val Asp Asp Tyr Ser Ser Glu Ser Asp Val Ile Ile Ile

20 25 30

Pro Ser Ala Leu Asp Phe Val Ser Gln Asp Glu Met Leu Thr Pro Leu

35 40 45

Gly Arg Leu Asp Lys Tyr Ala Ala Ser Glu Asn Ile Phe Asn Arg Gln

50 55 60

Met Val Ala Arg Ser Leu Leu Asp Thr Leu Arg Glu Val Cys Asp Asp

65 70 75 80

Glu Arg Asp Cys Ile Ala Val Leu Glu Arg Ile Ser Arg Leu Ala Asp

85 90 95

Asp Ser Glu Pro Thr Val Arg Ala Glu Leu Met Glu Gln Val Pro His

100 105 110

Ile Ala Leu Phe Cys Gln Glu Asn Arg Pro Ser Ile Pro Tyr Ala Phe

115 120 125

Ser Lys Phe Leu Leu Pro Ile Val Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Asn

130 135 140

Asn Gln Val Arg Lys Thr Ser Gln Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Glu

145 150 155 160

Gln Glu Leu Ile Glu Arg Phe Asp Val Glu Thr Lys Val Trp Pro Val

165 170 175

Leu Ile Glu Leu Thr Ala Pro Asp Ser Asn Asp Asp Val Lys Thr Glu

180 185 190

Ala Val Ala Ile Met Cys Lys Met Ala Pro Met Val Gly Lys Asp Ile

195 200 205

Thr Glu Arg Leu Ile Leu Pro Arg Phe Cys Glu Met Cys Cys Asp Cys

210 215 220

Arg Met Phe His Val Arg Lys Val Cys Ala Ala Asn Phe Gly Asp Ile

225 230 235 240

Cys Ser Val Val Gly Gln Gln Ala Thr Glu Glu Met Leu Leu Pro Arg

245 250 255

Phe Phe Gln Leu Cys Ser Asp Asn Val Trp Gly Val Arg Lys Ala Cys

260 265 270

Ala Glu Cys Phe Met Ala Val Ser Cys Ala Thr Cys Gln Glu Ile Arg

275 280 285

Arg Thr Lys Leu Ser Ala Leu Phe Ile Asn Leu Ile Ser Asp Pro Ser

290 295 300

Arg Trp Val Arg Gln Ala Ala Phe Gln Ser Leu Gly Pro Phe Ile Ser
305 310 315 320

Thr Phe Ala Asn Pro Ser Ser Ser Gly Gln Tyr Phe Lys Glu Glu Ser
325 330 335

Lys Ser Ser Glu Glu Met Ser Val Glu Asn Lys Asn Arg Thr Arg Asp
340 345 350

Gln Glu Ala Pro Glu Asp Val Gln Val Arg Pro Glu Asp Thr Pro Ser
355 360 365

Asp Leu Ser Val Ser Asn Ser Ser Val Ile Leu Glu Asn Thr Met Glu
370 375 380

Asp His Ala Ala Glu Ala Ser Gly Lys Pro Leu Gly Glu Ile Ser Val
385 390 395 400

Pro Leu Asp Ser Ser Leu Leu Cys Thr Leu Ser Ser Glu Ser His Gln
405 410 415

Glu Ala Ala Ser Asn Glu Asn Asp Lys Lys Pro Gly Asn Tyr Lys Ser
420 425 430

Met Leu Arg Pro Glu Val Gly Thr Thr Ser Gln Asp Ser Ala Leu Leu
435 440 445

Asp Gln Glu Leu Tyr Asn Ser Phe His Phe Trp Arg Thr Pro Leu Pro

450

455

460

Glu Ile Asp Leu Asp Ile Glu Leu Glu Gln Asn Ser Gly Gly Lys Pr

465

470

475

480

Ser Pro Glu Gly Pro Glu Glu Glu Ser Glu Gly Pro Val Pro Ser Ser

485

490

495

Pro Asn Ile Thr Met Ala Thr Arg Lys Glu Leu Glu Glu Met Ile Glu

500

505

510

Asn Leu Glu Pro His Ile Asp Asp Pro Asp Val Lys Ala Gln Val Glu

515

520

525

Val Leu Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Ser Leu Asp Ala His Glu Glu

530

535

540

Thr Ile Ser Ile Glu Lys Arg Ser Asp Leu Gln Asp Glu Leu Asp Ile

545

550

555

560

Asn Glu Leu Pro Asn Cys Lys Ile Asn Gln Glu Asp Ser Val Pro Leu

565

570

575

Ile Ser Asp Ala Val Glu Asn Met Asp Ser Thr Leu His Tyr Ile His

580

585

590

Asn Asp Ser Asp Leu Ser Asn Asn Ser Ser Phe Ser Pro Asp Glu Glu

595

600

605

Arg Arg Thr Lys Val Gln Asp Val Val Pro Gln Ala Leu Leu Asp Gln

610

615

620

Tyr Leu Ser Met Thr Asp Pro Ser Arg Ala Gln Thr Val Asp Thr Glu

625

630

635

640

Ile Ala Lys His Cys Ala Tyr Ser Leu Pro Gly Val Ala Leu Thr Leu

645

650

655

Gly Arg Gln Asn Trp His Cys Leu Arg Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Ala

660

665

670

Ser Asp Met Gln Trp Lys Val Arg Arg Thr Leu Ala Phe Ser Ile His

675

680

685

Glu Leu Ala Val Ile Leu Gly Asp Gln Leu Thr Ala Ala Asp Leu Val

690

695

700

Pro Ile Phe Asn Gly Phe Leu Lys Asp Leu Asp Glu Val Arg Ile Gly

705

710

715

720

Val Leu Lys His Leu His Asp Phe Leu Lys Leu Leu His Ile Asp Lys

725

730

735

Arg Arg Glu Tyr Leu Tyr Gln Leu Gln Glu Phe Leu Val Thr Asp Asn

740

745

750

Ser Arg Asn Trp Arg Phe Arg Ala Glu Leu Ala Glu Gln Leu Ile Leu

755

760

765

Leu Leu Glu Leu Tyr Ser Pro Arg Asp Val Tyr Asp Tyr Leu Arg Pro

770

775

780

Ile Ala Leu Asn Leu Cys Ala Asp Lys Val Ser Ser Val Arg Trp Ile

785

790

795

800

Ser Tyr Lys Leu Val Ser Glu Met Val Lys Lys Leu His Ala Ala Thr

805

810

815

Pro Pro Thr Phe Gly Val Asp Leu Ile Asn Glu Leu Val Glu Asn Phe

820

825

830

Gly Arg Cys Pro Lys Trp Ser Gly Arg Gln Ala Phe Val Phe Val Cys

835

840

845

Gln Thr Val Ile Glu Asp Asp Cys Leu Pro Met Asp Gln Phe Ala Val

850

855

860

His Leu Met Pro His Leu Leu Thr Leu Ala Asn Asp Arg Val Pro Asn

865

870

875

880

Val Arg Val Leu Leu Ala Lys Thr Leu Arg Gln Thr Leu Leu Glu Lys

885

890

895

Asp Tyr Phe Leu Ala Ser Ala Ser Cys His Gln Glu Ala Val Glu Gln

900

905

910

Thr Ile Met Ala Leu Gln Met Asp Arg Asp Ser Asp Val Lys Tyr Phe

915

920

925

Ala Ser Ile His Pro Ala Ser Thr Lys Ile Ser Glu Asp Ala Met Ser

930

935

940

Thr Ala Ser Ser Thr Tyr

945

950

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 4

accatgatta cgccaagctt g

21

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<220>

<223> 5'-phosphorylation

<400> 5

tcagagaggt cattc

15

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripti n of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 6

tcattgatgg gtcctcaa

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

agattcttga gctcagat

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

aatggtggca taaacatg

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 9

acagacaaat tgaacttc

18

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Probe Sequence

<400> 10

ctcatggaag caggaaagac accgagattc aagc

34

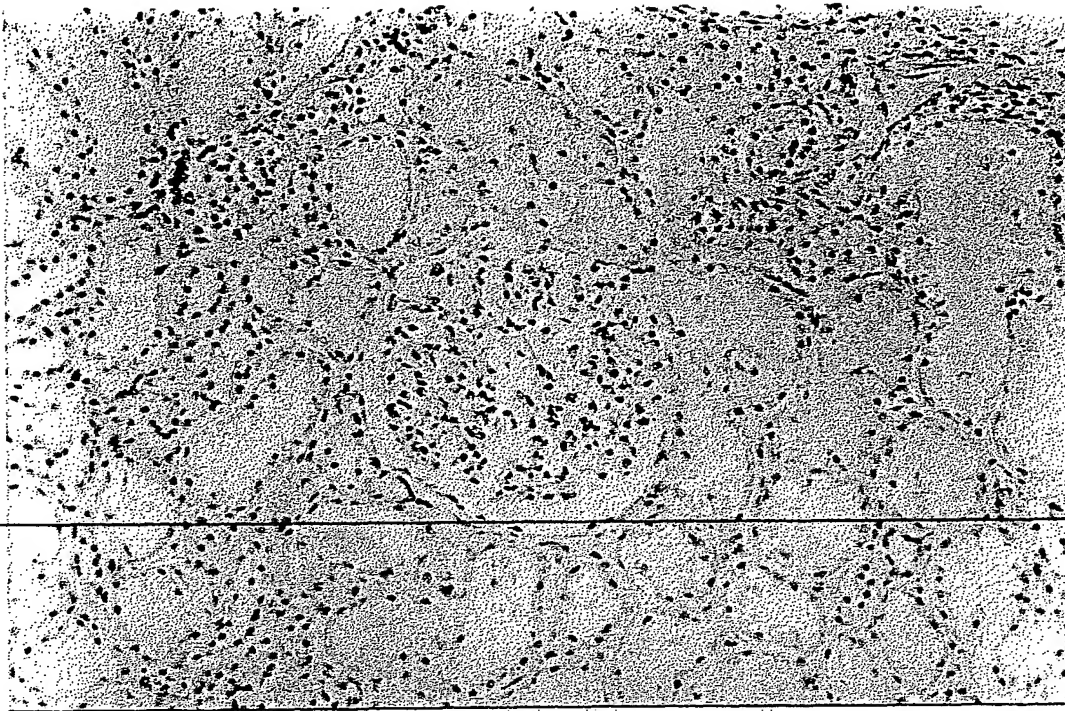
【図面の簡単な説明】

【図 1】

正常ヒト糸球体組織の、メグー 1 特異的なプローブによるインサイチュハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

本発明は、メサンギウム細胞で高頻度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

【解決手段】

本発明は、メサンギウム細胞で高頻度に発現しているDNA、そしてこのDNAがコードするタンパク質（メグー 1）を提供する。これらは、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142376]

1. 変更年月日 1999年 2月10日
[変更理由] 住所変更
住 所 神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101
氏 名 宮田 敏男

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 7 1 4 2 3 8 7]

1. 変更年月日 1 9 9 7 年 9 月 2 2 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都新宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1

氏 名 黒川 清
